

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 janvier 2004 (08.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/002509 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 38/05

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/001945

(22) Date de dépôt international : 24 juin 2003 (24.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/08036 27 juin 2002 (27.06.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INGRE-  
DIA [FR/FR]; 51, avenue Fernand Lobbedez, F-2000 Arras  
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : TAUZIN,  
Jérôme [FR/FR]; 10, rue aux Ours, F-62000 Arras (FR).  
MICLO, Laurent [FR/FR]; 143, avenue du Général

Leclerc, F-54600 Villers les Nancy (FR). LEFRANC,  
Catherine [FR/FR]; 60, avenue du Bois, F-59650  
Villeneuve d'Ascq (FR). BOUDIER, Jean-François  
[FR/FR]; 31, rue des Hortensias, F-62217 Agny (FR).  
GAILLARD, Jean-Luc [FR/FR]; 24, rue Daniel Leman-  
issier, F-14530 Luc sur Mer (FR).

(74) Mandataire : CABINET BEAU DE LOMENIE; 27bis,  
rue du Vieux Faubourg, F-59800 Lille (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF AT LEAST ONE \$G(A)\_{62}\$ CASEIN PEPTIDE WITH ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME INHIBIT-  
ING ACTIVITY FOR PREPARING MEDICINES, FOOD PRODUCTS AND FOOD COMPLEMENTS

(54) Titre : UTILISATION D'AU MOINS UN PEPTIDE DE LA CASEINE  $\alpha_{52}$  A ACTIVITE INHIBITRICE DE L'ENZYME DE  
CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I POUR LA PREPARATION DE MEDICAMENTS, D'ALIMENTS ET DE COMPLE-  
MENTS ALIMENTAIRES

(57) Abstract: The invention concerns the use for preparing anti-hypertensive medicines useful for treating or preventing hyper-  
tension, of one or more peptides having ACE inhibiting activity with  $IC_{50}$  values not more than 60  $\mu$ M, selected among peptide  
groups having the following amino acid sequences: Thr-Val-Tyr (SEQ ID NO: 1) Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys (SEQ ID NO:  
2) Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr (SEQ ID NO: 3) Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr (SEQ ID NO: 4) Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys  
(SEQ ID NO: 5) Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro (SEQ ID NO: 6) Phe-Ala-Leu-Pro (SEQ ID NO: 7). The invention also concerns a  
pharmaceutical composition containing, as active principle, an efficient amount of one or more said peptides, in combination with  
a pharmaceutically acceptable carrier. The invention further concerns a food product, in particular for supplementing the diet of  
persons liable to hypertension or wishing to prevent its occurrence, containing an efficient amount of one or more said peptides,  
in combination with food supports, in particular proteins, lipids or carbohydrates. Such a food product may also include at least  
one of the peptides having the following amino acid sequences: Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys (SEQ ID NO: 8)  
Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr (SEQ ID NO: 9) Tyr-Leu (SEQ ID NO: 10).

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation pour la préparation de médicaments à activité de type antihypertensive, utiles pour  
le traitement ou la prévention de l'hypertension d'un ou plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA avec  
des valeurs d' $IC_{50}$  de l'ordre ou inférieures à 60  $\mu$ M, choisis parmi le groupes de peptides ayant les séquences en acides aminés  
ci-après: Thr-Val-Tyr (SEQ ID NO : 1) Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys (SEQ ID NO : 2) Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr (SEQ ID NO  
: 3) Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr (SEQ ID NO : 4) Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys (SEQ ID NO : 5) Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro  
(SEQ ID NO : 6) Phe-Ala-Leu-Pro (SEQ ID NO : 7). Elle concerne aussi une composition pharmaceutique contenant, à titre de  
principe actif, une quantité efficace d'un ou plusieurs des peptides, précités, en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement  
acceptable. Elle concerne aussi un produit alimentaire, notamment utile pour supplémer l'alimentation des personnes sujettes à  
l'hypertension ou désireuses de prévenir son apparition, contenant une quantité efficace d'un ou plusieurs des peptides précités, en  
combinaison avec des supports alimentaires, notamment de nature protéique, lipidique ou glucidique. Un tel produit alimentaire  
peut comprendre également au moins l'un des peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après: Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-  
Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys (SEQ ID NO : 8) Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr (SEQ ID NO : 9) Tyr-Leu (SEQ ID NO: 10).



FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**Publiée :**

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

**UTILISATION D'AU MOINS UN PEPTIDE DE LA CASEINE  $\alpha_{s2}$  A ACTIVITE  
INHIBITRICE DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I POUR  
LA PREPARATION DE MEDICAMENTS, D'ALIMENTS ET DE  
COMPLEMENTS ALIMENTAIRES**

5

La présente invention concerne l'utilisation d'un ou plusieurs peptides de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine, ayant une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I pour la préparation de médicaments, d'aliments et de compléments alimentaires à activité de type anti-hypertensive.

10 La caséine entière est un ensemble de protéines du lait qui a été largement étudié, par exemple par GROSCLAUDE (1), SWAISGOOD (2) et GRAPPIN et RIBADEAU-DUMAS (3). La chromatographie sur DEAE-cellulose permet de fractionner à partir de la caséine entière, les caséines  $\gamma$ ,  $\kappa$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$ . Les séquences en acides aminés de ces caséines sont bien connues [EIGEL et  
15 *al.* (4), HOLT and SAWYER (5)] ; en particulier, celle de la caséine  $\alpha_{s2}$  a été déterminée par BRIGNON *et al.* (6) et STEWART *et al.* (7).

On sait déjà que certains fragments peptidiques de ces différentes caséines ont des activités biologiques diverses [CLARE and SWAISGOOD (8), MEISEL (9)]. En ce qui concerne la caséine  $\alpha_{s2}$ , les peptides  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f165-203)  
20 [ZUCHT *et al.* (10)],  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f183-207) et  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f164-179) [RECIO and VISSER (11)] présentent une activité antibactérienne et les peptides  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f189-193),  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f190-197) et  $\text{CN}\alpha_{s2}$ -(f198-202) inhibent l'enzyme de conversion de l'angiotensine I [CORVOL *et al.* (12)] avec des valeurs d' $\text{IC}_{50}$ , qui est la quantité de peptide nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique, égales à  
25 580, 300 et 400  $\mu\text{M}$  respectivement [MAENO *et al.* (13)]. Toutefois ces peptides ne présentent pas d'effet antihypertensif significatif *in vivo* sur des lignées de rats spontanément hypertendus 6 heures après l'administration orale d'une dose de 1 mg de peptide de synthèse/kg de rat [MAENO *et al.* (13)].

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I, dénommée ci-après l'ECA  
30 joue *in vivo* un rôle clé dans la régulation de la pression artérielle [WEBER (14)]. Les inhibiteurs de l'ECA (captopril, benazepril, enalapril, lisinopril...)

[PIEPHO (15)] sont une des principales classes de molécules utilisées pour lutter contre l'hypertension. Ils sont particulièrement indiqués pour les patients diabétiques et les insuffisants cardiaques ou rénaux [O.M.S. (16), J.N.C. (17)].

- 5 Il importe, selon le demandeur, de proposer des inhibiteurs de l'ECA qui présentent des valeurs d' $IC_{50}$  qui soient nettement inférieures à celles des trois peptides de la caséine  $\alpha_{s2}$ , cités ci-dessus. Par valeurs nettement inférieures, on peut retenir des valeurs de l'ordre de ou inférieures à 60  $\mu M$ , sachant toutefois qu'il subsiste une certaine imprécision quant à la valeur obtenue en
- 10 fonction des conditions opératoires et qu'il convient donc de se reporter aux conditions décrites ci-après pour la détermination de ladite valeur.

Or le demandeur a trouvé par des tests *in vitro* que certains peptides de la caséine  $\alpha_{s2}$  présentent une activité inhibitrice sur l'ECA, non mentionnée jusqu'à lors, avec des valeurs de l'ordre de ou inférieures à 60  $\mu M$ . Il s'agit de

15 cinq peptides qui peuvent être obtenus par hydrolyse trypsique de la caséine  $\alpha_{s2}$  à savoir  $CN\alpha_{s2}$ -(f25-32),  $CN\alpha_{s2}$ -(f92-98),  $CN\alpha_{s2}$ -(f174-179),  $CN\alpha_{s2}$ -(f174-181),  $CN\alpha_{s2}$ -(f182-184) et de deux autres peptides obtenus par synthèse chimique à savoir  $CN\alpha_{s2}$ -(f25-30) et  $CN\alpha_{s2}$ -(f174-177).

C'est donc l'objet de la présente invention que de revendiquer

20 l'utilisation pour la préparation de médicaments à activité de type anti-hypertensive, utiles pour le traitement ou la prévention de l'hypertension, d'un ou plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA avec des valeurs d' $IC_{50}$  de l'ordre de ou inférieures à 60  $\mu M$ , choisis parmi le groupe de peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

- 25 Thr-Val-Tyr,  
1  
Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys,  
1 5  
Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr,  
30 1 5  
Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr,  
1 5

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys,

1 5

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro,

1 5

5 Phe-Ala-Leu-Pro.

1

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant à titre d'ingrédient actif une quantité efficace d'au moins un desdits peptides en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention concerne également les produits alimentaires qui contiennent à titre de principe actif au moins un desdits peptides, ou bien de l'hydrolysate trypsique total contenant au moins un desdits peptides ou bien une fraction de cet hydrolysate contenant au moins un desdits peptides en combinaison avec des supports alimentaires, notamment de nature protéique, lipidique ou glucidique. Ces compléments alimentaires peuvent convenir pour supplémenter l'alimentation des personnes sujettes notamment à l'hypertension ou afin de prévenir son apparition.

Dans le groupe de peptides de la présente invention,  
le peptide Thr-Val-Tyr, [TVY (SEQ ID NO : 1)], de poids moléculaire 381,4, correspond au peptide 182-184 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys, [NMAINPSK (SEQ ID NO : 2)], de poids moléculaire 874,0, correspond au peptide 25-32 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr, [FALPQY (SEQ ID NO : 3)], de poids moléculaire 737,9, correspond au peptide 174-179 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr, [FPQYLQY (SEQ ID NO : 4)] , de poids moléculaire 958,1, correspond au peptide 92-98 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys, [FALPQYLK (SEQ ID NO : 5)], de poids moléculaire 979,2, correspond au peptide 174-181 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro, [NMAINP (SEQ ID NO : 6)] de poids moléculaire 658,8, correspond au peptide 25-30 de la caséine  $\alpha_{s2}$ ,

le peptide Phe-Ala-Leu-Pro, [FALP (SEQ ID NO : 7)], de masse moléculaire 446,6, correspond au peptide 174-177 de la caséine  $\alpha_{s2}$ .

Certains de ces peptides peuvent être obtenus à partir de la caséine  $\alpha_{s2}$  par hydrolyse enzymatique, de préférence à l'aide de la trypsine. Ils peuvent être ensuite concentrés ou isolés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse et autres techniques de chromatographie (gel filtration, échange d'ions, etc...), par centrifugation (sur membrane) et autres techniques de séparation sur membrane (microfiltration, ultrafiltration, etc...).

Ces peptides peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique selon les procédés bien connus de l'homme de l'art, tels que ceux décrits par exemple par MERRIFIELD (18).

La caséine entière est obtenue à partir du lait par précipitation acide et neutralisation à l'aide d'un alcali selon des procédés bien connus. Par exemple, on peut utiliser la méthode de NITSCHMANN et LEHMANN (19).

La caséine  $\alpha_{s2}$ , utilisée comme produit de départ pour l'obtention de peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention, peut être obtenue par les procédés classiques bien connus de l'homme du métier à partir du lait, de caséines entières, de caséinates et de concentrés de protéines totales du lait, obtenus par exemple selon les procédés décrits par THOMSON (20) et MAUBOIS (21).

Par exemple on peut préparer la caséine  $\alpha_{s2}$  en adaptant la méthode décrite par SANOGO et *al.* (22). Cette méthode est une méthode de fractionnement sur DEAE-cellulose utilisant un gradient discontinu de chlorure de calcium comme éluant. Elle permet de fractionner rapidement l'ensemble des caséines. Elle peut être avantageusement mise en œuvre avec, comme support échangeur d'anions, la DEAE-cellulose DE 23 [commercialisée par Whatman, Maidstone, Grande-Bretagne] qui est une résine sèche. Après cette étape, afin d'éliminer toute trace d'autres protéines, une étape supplémentaire de chromatographie d'interaction hydrophobe en appliquant un gradient décroissant en phosphate de sodium sur une colonne TSKgel phenyl 5PW [TosoHaas, Stuttgart, Allemagne] peut être réalisée.

L'hydrolysats trypsique total de la caséine  $\alpha_{s2}$  est obtenu par action de la trypsine sur la caséine  $\alpha_{s2}$ , par exemple dans les conditions décrites ci-après.

Les premier, deuxième, troisième, quatrième et cinquième peptides [SEQ ID NO : 1, 2, 3, 4, 5] du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention sont purifiés, directement à partir de l'hydrolysats trypsique total, par fractionnement par CLHP en phase inverse à l'aide d'un gradient d'acétonitrile. Les pics peptidique collectés, correspondant à chacun de ces cinq peptides, sont lyophilisés.

Chacun de ces cinq peptides, seul ou en mélange, ou bien une fraction de l'hydrolysats trypsique total contenant au moins l'un de ces cinq peptides ou bien l'hydrolysats trypsique total contenant les cinq peptides peut être utilisé comme principe actif soit dans des compléments alimentaires en combinaison avec des supports alimentaires (par exemple des protéines, des lipides ou des glucides), soit dans des produits alimentaires destinés à une alimentation particulière.

Les médicaments utiles pour le traitement de l'hypertension préparés avec au moins l'un des sept peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention peuvent être administrés par voie orale.

Pour une administration par voie orale, les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme de comprimés, gélules, poudres, granulés ou toute autre forme administrable par voie orale.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail par l'exemple ci-après non limitatif :

#### 25 A – Préparation de la caséine $\alpha_{s2}$

Cinq grammes de caséinate d'ammonium sont dissous dans 200 mL de tampon acétate 20 mM, pH 6,6 contenant 3,3 M d'urée, 35 mM d'EDTA et 0,1% de 2-mercaptoéthanol puis on ajoute 20 g de DEAE-cellulose DE 23 équilibrée dans 150 mL du même tampon. Le mélange résultant est agité pendant 15 min à 25°C puis filtré sur un filtre n°41 [Whatman]. Le rétentat est élué avec 2 fois 250 mL de tampon acétate-urée-EDTA sans 2-mercaptoéthanol. Les trois filtrats sont regroupés. Ce premier cycle

d'agitation-filtration permet d'éliminer une fraction F0. Les fractions caséiniques suivantes (F1 et F2) sont éluées selon la même procédure en rajoutant au tampon 30 et 70 mM de  $\text{CaCl}_2$  respectivement. De l'EDTA est ajouté aux fractions à raison de 15 mM dans la fraction F0, 45 mM dans la  
5 fraction F1 et 85 mM dans la fraction F2. Les filtrats F0, F1, F2, dialysés contre de l'eau ultra-pure puis lyophilisés, sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée afin de visualiser le fractionnement. La fraction F1 contient la caséine  $\alpha_{s2}$ .

La purification de la caséine  $\alpha_{s2}$  est achevée par chromatographie  
10 d'interactions hydrophobes sur une colonne TSKgel phenyl 5PW [TosoHaas, Stuttgart, Allemagne] 150 x 21,5 mm. La fraction F1 (1 mg.mL<sup>-1</sup>) est mise en solution dans un tampon phosphate de sodium 0,48 M, pH 6,4, contenant 2,5 M d'urée et en présence de 0,1% de 2-mercaptoéthanol puis filtrée sur un filtre 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF [Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, Etats-Unis]. Vingt  
15 milligrammes de solution protéique sont injectés. Un gradient non-linéaire de 0,48 M à 0,037 M en phosphate de sodium pH 6,4 contenant 2,5 M d'urée est appliqué avec un débit de 6,0 mL.min<sup>-1</sup> comme suit : de 480 mM à 126 mM (18 min), 126 mM (3 min), de 126 mM à 103 mM (3 min), 103 mM (3 min), de 103 mM à 72 mM (5 min), 72 mM (5 min), de 72 mM à 37 mM (4 min), 37 mM (17  
20 min). La caséine  $\alpha_{s2}$  bovine collectée est dialysée, lyophilisée et stockée sous vide à +4°C.

#### B – Préparation de l'hydrolysat trypsique de la caséine $\alpha_{s2}$

La caséine  $\alpha_{s2}$  est mise en solution à la concentration de 0,05% (p/v) dans  
25 100 mL de tampon phosphate de sodium 67 mM, pH 8,1 contenant 0,02% d'azoture de sodium. La trypsine (E.C. 3.4.21.4) pancréatique bovine immobilisée sur billes d'agarose et traitée par la TPCK (N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylcétone) [Sigma, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis] est ajoutée, après plusieurs lavage dans le tampon précédent et filtration, à la  
30 solution de caséine  $\alpha_{s2}$  pour obtenir une concentration de 0,2 unités N $\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) par mL. L'hydrolyse se déroule à 37°C pendant 24 heures. La réaction est stoppée en diluant deux fois le mélange à

l'aide d'acétonitrile 4% contenant 0,2% d'acide trifluoroacétique (TFA), puis en filtrant sur un filtre 0,45  $\mu$ m PVDF. L'hydrolysate est conservé à -30°C.

5 C - Fractionnement de l'hydrolysate par CLHP-phase inverse en gradient d'acétonitrile

L'hydrolysate est fractionné sur colonne C18 XTerra™ [Waters, Milford, Massachussets, Etats-Unis] 250 x 4,6 mm thermostatée à 37°C. 500  $\mu$ L d'échantillon (0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) sont injectés. Le profil d'élution comporte une phase isocratique de 3 min à 1,6% d'acétonitrile dans l'eau (en présence de  
10 0,1% de TFA) suivie d'un gradient linéaire permettant d'atteindre 40% d'acétonitrile en 87 min au débit d'1 mL.min<sup>-1</sup>.

Le profil peptidique est représenté sur la figure 1 où l'absorbance à 215 nm est portée en ordonnée et le temps d'élution en abscisse.

Cinq des sept peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la  
15 présente invention correspondent aux pics peptidiques référencés de 1 à 4 sur la figure 1. Ces peptides sont collectés et lyophilisés deux fois. Leur identification est réalisée en déterminant leur composition en acides aminés par la méthode à la ninhydrine de HAMILTON (23) ainsi que par spectrométrie de masse couplée à la CLHP, ESI-LC/MS ("electrospray source ionization" ou  
20 ionisation electrospray), voire par MS/MS, spectrométrie de masse en tandem.

Le pic 1 collecté à 25 min contient le peptide TVY (SEQ ID NO : 1).

Le pic 2 collecté à 29 min contient le peptide NMAINPSK (SEQ ID NO : 2).

Le pic 3 collecté à 57 min contient le peptide FALPQY (SEQ ID NO : 3).

Le pic 4 collecté à 60 min contient les peptides FPQYLQY (SEQ ID NO : 4)  
25 et FALPQYLK (SEQ ID NO : 5).

Les deux autres peptides, à savoir NMAINP (SEQ ID NO : 6) et FALP (SEQ ID NO : 7), peuvent être obtenus par synthèse chimique selon les procédés conventionnels. Il en est d'ailleurs de même pour les cinq peptides obtenus préférentiellement par fractionnement de l'hydrolysate tryptique total de  
30 caséine  $\alpha_{s2}$ .

D - Test *in vitro* des peptides sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

Le principe de l'expérience repose sur la mesure de l'activité résiduelle de l'ECA sur un substrat de synthèse, l'Hippuryl-His-Leu-OH, en présence d'un peptide potentiellement inhibiteur [CUSHMAN and CHEUNG (24)]. L'acide hippurique libéré est dosé par CHLP et sa quantité est comparée à un témoin sans inhibiteur.

L'incubation est réalisée dans un tampon CHES 50 mM, pH 8,3, contenant 5 mM d'Hippuryl-His-Leu-OH, 350 mM de NaCl, 3,33 U.L<sup>-1</sup> d'ECA et 5% d'éthanol. Le mélange (volume final : 150 µL), après 10 min de préincubation sans l'enzyme, est incubé 60 min à 37°C. La réaction est arrêtée à l'aide de captopril (5 µM), d'EDTA (1 mM) et de TFA (0,067%). L'acide hippurique libéré est quantifié par CLHP en utilisant une colonne C18 Symmetry® [Waters, Milford, Massachussets, Etats-Unis] 150 x 2,1 mm thermostatée à 37°C. Les échantillons sont filtrés sur filtre 0,45 µm PVDF et 40 µL sont injectés. Un gradient d'acétonitrile dans l'eau (en présence de 0,1% de TFA) est appliqué à un débit de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>. Ce gradient d'élution passe de 13 à 50% d'acétonitrile en 7 min, puis atteint 99% en 0,5 min et est maintenu à cette valeur durant 1,5 min.

La méthode de détermination des IC<sub>50</sub> est validée en comparant la valeur trouvée pour le captopril (0,022 µM), un inhibiteur de l'ECA connu, aux valeurs bibliographiques (0,023 µM [CUSHMAN et al. (25)], 0,018 µM [DUNCAN et al. (26)], 0,007 µM [PIHLANTO-LEPPÄLÄ et al. (27)]).

Les quatre pics chromatographiques (1 à 4) collectés à partir de l'hydrolysat tryptique de caséine α<sub>s2</sub> et correspondant aux cinq peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention sont testés deux fois à une concentration de 50 µM en amines primaires. Les pics chromatographiques numérotés de 5 à 7 sont testés dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2 où le pourcentage d'inhibition est porté en ordonnée et le numéro du pic chromatographique en abscisse. On constate que les pics 1 à 4 contenant les peptides du groupe

sélectionné dans le cas de la présente invention inhibent l'ECA à plus de 40%, parmi lesquels le pic 4 contenant les peptides FPQYLQY (SEQ ID NO : 4) et FALPQYLK (SEQ ID NO : 5), le pic 3 contenant le peptide FALPQY (SEQ ID NO : 3) et le pic 1 contenant le peptide TVY (SEQ ID NO : 1) inhibent l'ECA à plus de 70%.

Des peptides de synthèse sont utilisés pour déterminer précisément les  $IC_{50}$  de ces 5 peptides. Les peptides sont testés deux fois dans un premier temps à des concentrations comprises entre 0,1 et 250 à 500  $\mu M$  pour obtenir une estimation de leur  $IC_{50}$ , puis testés en triple sur une gamme de concentrations appropriée.

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes de la figure 3 où le logarithme du rapport activité/inhibition est porté en ordonnée et le logarithme de la concentration en peptide en abscisse. Ceci permet de linéariser la courbe d'inhibition et d'en déduire des valeurs d' $IC_{50}$  d'après l'équation des droites. Les valeurs d' $IC_{50}$  sont récapitulées dans le tableau 1.

Elles sont toutes de l'ordre ou inférieures à 60  $\mu M$ , étant noté que les peptides FALPQY (SEQ ID NO : 3) et FALPQYLK (SEQ ID NO : 5) sont les plus performants avec une valeur d' $IC_{50}$  de 4,3  $\mu M$ .

Les sept peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention ont des séquences en acides aminés différentes de celles des peptides inhibiteurs de l'ECA décrites à ce jour [FITZGERALD and MEISEL (28), YAMAMOTO and TAKANO (29), PIHLANTO-LEPPÄLÄ (30), NURMINEN (31), TAKANO (32)] y compris de celles rapportées par MAENO *et al.* (13) obtenues à partir de la caséine  $\alpha_{s2}$  :  $CN\alpha_{s2}$ -(f198-202),  $CN\alpha_{s2}$ -(f190-197) et  $CN\alpha_{s2}$ -(f189-193). Comme précisé ci-dessus, deux peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention, obtenus par fractionnement de l'hydrolysat trypsique de la caséine  $\alpha_{s2}$  ont une  $IC_{50}$  inférieure à 5  $\mu M$  et deux autres ont une  $IC_{50}$  inférieure à 20  $\mu M$ , ce qui les classe parmi les inhibiteurs les plus actifs de l'ECA parmi les peptides naturels obtenus par un processus mono-enzymatique sur des protéines du lait.

En ce qui concerne les deux peptides NMAINP (SEQ ID NO : 6) et FALP (SEQ ID NO : 7), qui ne sont pas obtenus directement par fractionnement de

l'hydrolysat trypsique de la caséine  $\alpha_{s2}$ , ils sont remarquables d'une part en ce qu'ils possèdent un résidu prolyl à leur extrémité C-terminale, ce qui est commun à certains autres peptides inhibiteurs de l'ECA [MARUYAMA *et al.* (33), KOHMURA *et al.* (34, 35, 36), NAKAMURA *et al.* (37)], et d'autre part en ce que leur séquence en acides aminés est entièrement comprise dans deux autres peptides NMAINPSK (SEQ ID NO : 2) et FALPQY (SEQ ID NO : 3) qui sont obtenus directement par un tel fractionnement. De ce fait, il est envisageable que l'utilisation comme médicament ou complément alimentaire de ces deux derniers peptides (SEQ ID NO 2 et 3) puisse conduire, par rupture de la liaison peptidique adéquate, à la formation *in vivo* des deux premiers peptides (SEQ ID NO : 6 et 7).

Il est à noter que l'utilisation d'au moins un des sept peptides du groupe sélectionné dans le cadre de la présente invention pour la préparation de médicaments, d'aliments ou de compléments alimentaires peut se faire en combinaison avec un ou plusieurs autres peptides, ayant une activité inhibitrice de l'ECA mais ayant une valeur d'IC<sub>50</sub> supérieure à 60  $\mu$ M. Ce serait le cas lors de la mise en œuvre de l'hydrolysat trypsique total de la caséine  $\alpha_{s2}$  ou d'une fraction de celui-ci, contenant au moins un peptide du groupe. Cette combinaison peut s'avérer profitable pour l'activité inhibitrice *in vivo* vis-à-vis de l'ECA.

De préférence cette combinaison ferait intervenir les peptides suivants :

(SEQ ID NO : 8), CN $\alpha_{s2}$ -(f81-91), ALNEINQFYQK, Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys, pic 5 élué à 52 min,

(SEQ ID NO : 9), CN $\alpha_{s2}$ -(f81-89), ALNEINQFY, Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr, pic 6 élué à 59 min,

(SEQ ID NO : 10), CN $\alpha_{s2}$ -(f206-207), YL, Tyr-Leu, pic 7 élué à 31 min,

qui peuvent aussi être obtenus par fractionnement de l'hydrolysat trypsique de la caséine  $\alpha_{s2}$  et qui inhibent l'ECA entre 25 et 35% à une concentration de 50  $\mu$ M en amines primaires (Figure 2).

### Références bibliographiques

- (1) GROSCLAUDE, F., 1988, Le polymorphisme des principales lactoprotéines bovines, INRA Prod. Anim., 1, 5-17.
- (2) SWAISGOOD, H. E., 1992, Chemistry of the caseins in P. F. Fox: Advanced dairy chemistry, volume 1, Proteins, Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 63-109.
- (3) GRAPPIN, R. and RIBADEAU-DUMAS, B., 1992, Analytical methods for milk proteins in P. F. Fox: Advanced dairy chemistry, volume 1, Proteins, Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 1-61.
- (4) EIGEL, W. N., BUTLER, J. E., ERNSTROM, C. A., FARRELL, H. M., HARWALKAR, V. R., JENNESS, R. and WHITNEY, R. McL., 1984, Nomenclature of proteins of cow's milk : fifth revision, J. Dairy Sci., 67, 1599-1631.
- (5) HOLT, C. and SAWYER, L., 1988, Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions, Protein Eng., 2, 251-259.
- (6) BRIGNON, G., RIBADEAU-DUMAS, B., MERCIER, J.-C., PELISSIER, J.-P. and DAS, B. C., 1977, Complete amino acid sequence of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein, FEBS Lett., 76, 274-279.
- (7) STEWART, A.F., BONSING, J., BEATTIE, C. W., SHAH, F., WILLIS, I. M. and MACKINLAY, A. G., 1987, Complete nucleotide sequence of bovine  $\alpha_{s2}$  and  $\beta$ -casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species, Mol. Biol. Evol., 4, 231-241.
- (8) CLARE, D. A. and SWAISGOOD, H. E., 2000, Bioactive milk peptides: a prospectus, J. Dairy Sci., 83, 1187-1195.
- (9) MEISEL, H., 1997, Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins, Biopolymers, 43, 119-128.
- (10) ZUCHT, H.-D., RAID, M., ADERMANN, K., MÄGERT, H.-J. and FORSSMANN, W.-G., 1995, Casocidin-I: a casein- $\alpha_{s2}$  derived peptide exhibits antibacterial activity, FEBS Lett., 372, 185-188.
- (11) RECIO, I. and VISSER, S., 1999, Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine- $\alpha_{s2}$ , Biochim. Biophys. Acta, 1428, 314-326.

- (12) CORVOL, P., WILLIAMS, T. A., SOUBRIER, F., 1995, Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme, *Methods Enzymol.*, 248, 243-305.
- (13) MAENO, M., YAMAMOTO, N. and TAKANO, T., 1996, Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase  
5 from *Lactobacillus helveticus* CP790, *J. Dairy Sci.*, 79, 1316-1321.
- (14) WEBER, M. A., 1999, Interrupting the renin-angiotensin system: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in the treatment of hypertension, 12, 189S-194S.
- (15) PIEPHO, R. W., 2000, Overview of the angiotensin-converting-enzyme  
10 inhibitors, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 57, S3-S7.
- (16) Guidelines subcommittee, 1999, World Health Organization-International Society of Hypertension. Guidelines for the management of hypertension, *J. Hypertens.*, 17, 151-183.
- (17) Joint National Committee, 1997, Detection and treatment of high blood  
15 pressure. The sixth report of the joint national committee on prevention and treatment of high blood pressure (JNC VI), *Arch. Intern. Med.*, 157, 2413-2446.
- (18) MERRIFIELD, R. B., 1963, Solid phase peptide synthesis I. Synthesis of a tetrapeptide, *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 2149-2154.
- (19) NITSCHMANN, H. S. and LEHMANN, W., 1947, Zum problem der  
20 labwirkung auf casein, *Helv. Chim. Acta*, 130, 804.
- (20) THOMSON, A. R., 1984, Recent developments in protein recovery and purification, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B, 190-198.
- (21) MAUBOIS, J.-L., 1984, Separation, extraction and purification of milk protein components, *Lait*, 64, 485-495.
- 25 (22) SANOGO, T., PAQUET, D., AUBERT, F. and LINDEN, G., 1989. Purification of  $\alpha_{s1}$ -casein by fast protein liquid chromatography, *J. Dairy Sci.*, 72, 2242-2246.
- (23) HAMILTON, P. B., 1963, Ion exchange chromatography of amino acids. A single column, high resolving, fully automatic procedure, *Anal. Chem.*, 35,  
30 2055-2063.

- (24) CUSHMAN, D. W. and CHEUNG, H. S., 1971, Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochem. Pharm.*, 20, 1637-1648.
- (25) CUSHMAN, D. W., CHEUNG, H. S., SABO, E. F. and ONDETTI, M. A., 1977,  
5 Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids, *Biochemistry*, 16, 5484-5491.
- (26) DUNCAN, A. C., JÄGER, A. K. and VAN STADEN, J., 1999, Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, *J. Ethnopharm.*, 68, 63-70.
- (27) PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., ROKKA, T. and KORHONEN, H., 1998, Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins, *Int. Dairy J.*, 8, 325-331.
- (28) FITZGERALD, R. J. and MEISEL, H., 2000, Milk protein-derived inhibitors of  
15 angiotensin-I-converting enzyme, *British J. Nutr.*, 84, S33-S37.
- (29) YAMAMOTO, N. and TAKANO, T., 1999, Antihypertensive peptides derived from milk proteins, *Nahrung*, 3, S159-S164.
- (30) PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A., 2001, Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Tech.*, 11,  
20 347-356.
- (31) NURMINEN, M.-L., 2000, Milk-derived peptides and blood pressure, *Bull. IDF*, 353, 11-15.
- (32) TAKANO, T., 1998, Milk derived peptides and hypertension-reduction, *Int. Dairy J.*, 8, 375-381.
- (33) MARUYAMA, S., NAKAGOMI, K., TOMIZUKA, N. and SUZUKI, H., 1985,  
25 Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1404-1409.
- (34) KOHMURA, M., NIO, N., KUBO, K. MINOSHIMA, Y., MUNEKATA, E. and  
30 ARIYOSHI, Y., 1989, Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2107-2114.

(35) KOHMURA, M., NIO, N. and ARIYOSHI, Y., 1990a, Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic fragments of human  $\kappa$ -casein, Agric. Biol. Chem., 54, 835-836.

5 (36) KOHMURA, M., NIO, N. and ARIYOSHI, Y., 1990b, Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of various  $\beta$ -casein, Agric. Biol. Chem., 54, 1101-1102.

(37) NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, N., SAKAI, K. and TAKANO, T., 1995, Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I converting enzyme, J. Dairy Sci., 78, 1253.

# Tableau 1

Inhibiteur	N° <sup>a</sup>	Séquence	ID NO <sup>b</sup>	Inhibition (%) <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)
Captopril				> 99.5	0.022
CNα <sub>S2</sub> -(f 182-184)	1	TVY	1	70.2	15
CNα <sub>S2</sub> -(f25-32)	2	NMAINPSK	2	42.5	60
CNα <sub>S2</sub> -(f 174-179)	3	FALPQY	3	82.7	4.3
CNα <sub>S2</sub> -(f 92-98)	4	FPQYLQY	4	86.0 <sup>d</sup>	14
CNα <sub>S2</sub> -(f 174-181)	4	FALPQYLK	5	86.0 <sup>d</sup>	4.3
CNα <sub>S2</sub> -(f 81-91)	5	ALNEINQFYQK	8	27.2	264
CNα <sub>S2</sub> -(f 81-89)	6	ALNEINQFY	9	32.2	219
CNα <sub>S2</sub> -(f 206-207)	7	YL	10	34.8	nd

<sup>a</sup> numéro du pic en CLHP sur la figure 1 ; <sup>b</sup> numéro d'identification de la séquence du peptide ; <sup>c</sup> déterminé avec une concentration en amines primaires ou en captopril égale à 50 μM ; <sup>d</sup> CNα<sub>S2</sub>-(f92-98) et CNα<sub>S2</sub>-(f174-181) étaient mélangés dans le pic n°4 : nd, non déterminée.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la préparation de médicaments à activité de type antihypertensive, utiles pour le traitement ou la prévention de l'hypertension d'un ou plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de ou inférieures à 60  $\mu$ M, choisis parmi le groupe de peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

Thr-Val-Tyr ( SEQ ID NO : 1 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys ( SEQ ID NO : 2 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 3 )

Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 4 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys ( SEQ ID NO : 5 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro ( SEQ ID NO : 6 )

Phe-Ala-Leu-Pro ( SEQ ID NO : 7 )

2. Composition pharmaceutique contenant à titre de principe actif une quantité efficace d'un ou plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre ou inférieures à 60  $\mu$ M, choisis parmi le groupe de peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

Thr-Val-Tyr ( SEQ ID NO : 1 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys ( SEQ ID NO : 2 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 3 )

Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 4 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys ( SEQ ID NO : 5 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro ( SEQ ID NO : 6 )

Phe-Ala-Leu-Pro ( SEQ ID NO : 7 )

en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

3. Produit alimentaire, notamment utile pour compléter l'alimentation des personnes sujettes à l'hypertension ou désireuses de prévenir son apparition, contenant une quantité efficace d'un ou plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA avec des valeurs d'IC<sub>50</sub>

de l'ordre ou inférieures à 60  $\mu$ M, choisis parmi le groupe de peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

Thr-Val-Tyr ( SEQ ID NO : 1 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys ( SEQ ID NO : 2 )

5 Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 3 )

Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 4 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys ( SEQ ID NO : 5 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro ( SEQ ID NO : 6 )

Phe-Ala-Leu-Pro ( SEQ ID NO : 7 )

10 en combinaison avec des supports alimentaires, notamment de nature protéique, lipidique ou glucidique.

4. Produit alimentaire selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une fraction de l'hydrolysat trypsique de la caséine  $\alpha_{s2}$  contenant au moins l'un des peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

Thr-Val-Tyr ( SEQ ID NO : 1 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys ( SEQ ID NO : 2 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 3 )

Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 4 )

20 Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys ( SEQ ID NO : 5 )

5. Produit alimentaire selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend l'hydrolysat trypsique total de la caséine  $\alpha_{s2}$  contenant les cinq peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

25 Thr-Val-Tyr ( SEQ ID NO : 1 )

Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys ( SEQ ID NO : 2 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 3 )

Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr ( SEQ ID NO : 4 )

Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys ( SEQ ID NO : 5 )

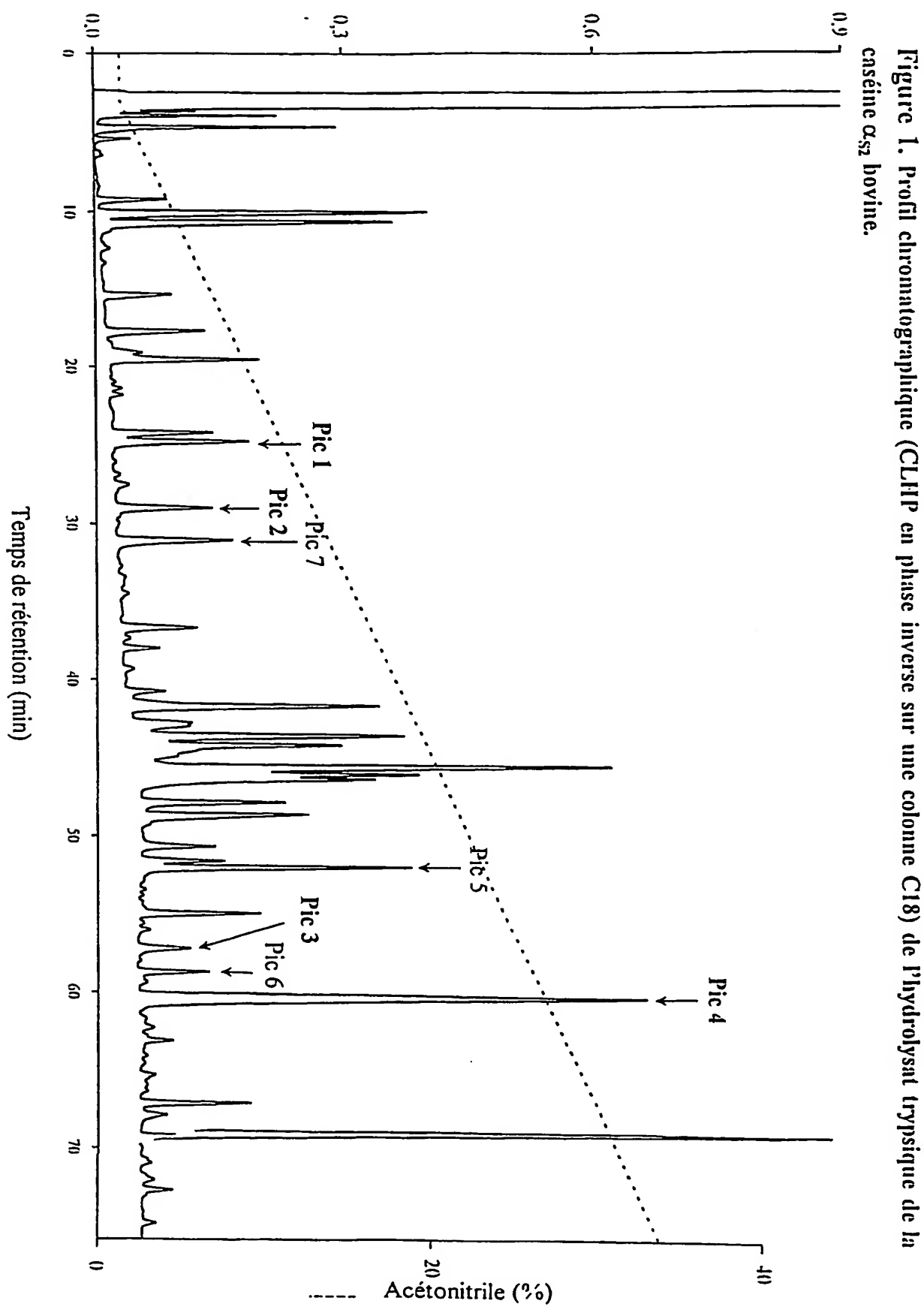
30

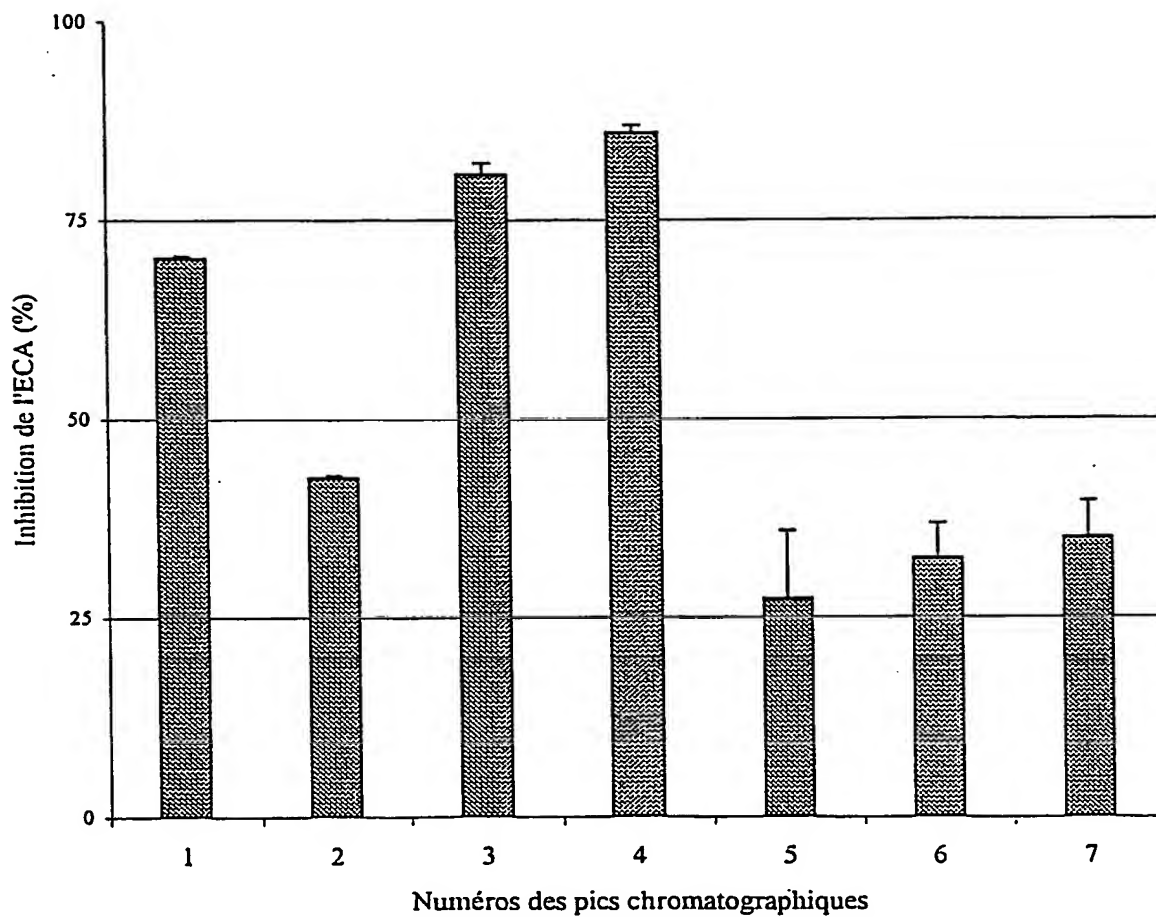
6. Produit alimentaire selon l'une des revendications 3 à 5 caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un des peptides ayant les séquences en acides aminés ci-après :

Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys ( SEQ ID NO : 8 )

5 Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr ( SEQ ID NO : 9 )

Tyr-Leu ( SEQ ID NO : 10 ).





**Figure 2. Activité inhibitrice de l'ECA de peptides trypsiques issus de la caséine  $\alpha_{S2}$  bovine (les numéros font référence aux pics chromatographiques donnés par la Figure 1)**

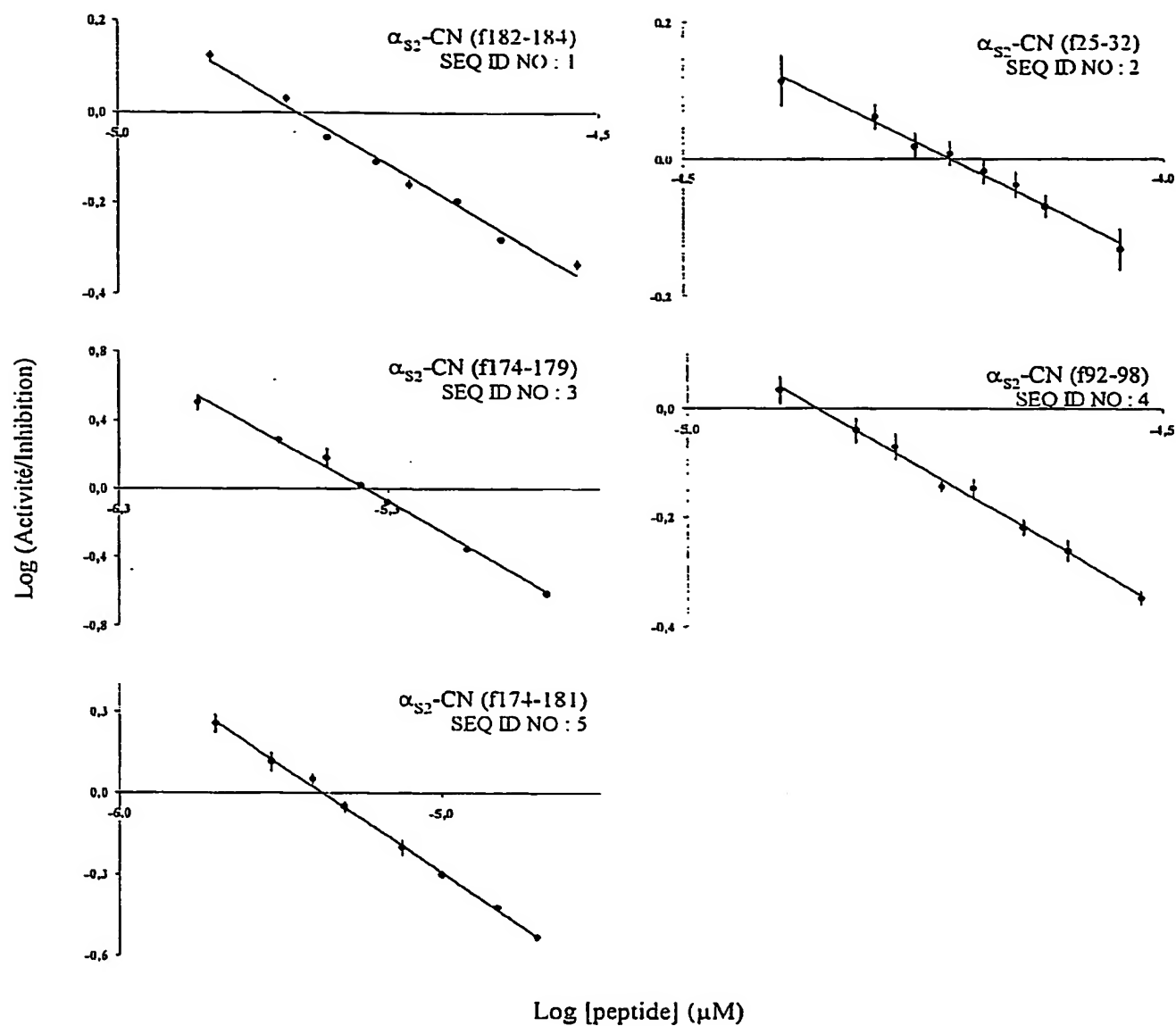


Figure 3. Détermination de la valeur d' $IC_{50}$  de peptides sélectionnés à partir de la Figure 2.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INGREDIA

<120> Utilisation d'au moins un peptide de la caséine alpha (s2) à activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I pour la préparation de médicaments, d'aliments et de compléments alimentaires

<130> 1H9O487O/0004FRO

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 1

Thr Val Tyr

1

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 2

Asn Met Ala Ile Asn Pro Ser Lys

1

5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 3

Phe Ala Leu Pro Gln Tyr

1

5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 4

Phe Pro Gln Tyr Leu Gln Tyr

1

5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 5

Phe Ala Leu Pro Gln Tyr Leu Lys

1

5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 6

Asn Met Ala Ile Asn Pro

1

5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 7

Phe Ala Leu Pro

1

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 8

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr Gln Lys

1

5

10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 9

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Gln Phe Tyr

1

5

<210> 10

<211> 2

<212> PRT

<213> caséine alpha (s2)

<400> 10

Tyr Leu

1